Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof.Dr.L.Felix Müller

KERNMESSUNGEN AN LYMPHOCYTEN KRANKER HUNDE

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Jörg Treppenhauer
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1965
Journal-Nr.: 504

Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof.Dr.L.Felix Müller

KERNMESSUNGEN AN LYMPHOCYTEN KRANKER HUNDE

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades
eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Jörg Treppenhauer
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1965
Journal-Nr.: 504

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

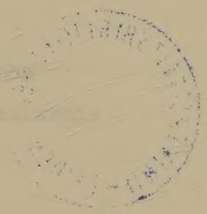
Dekan: Prof. Dr. J. Boch

Referent: Prof. Dr. H. Niepage

Correferent: Prof. Dr. L.F. Müller

Tag der Promotion: 23. Juli 1965

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	3
Schrifttum	4 - 12
Material	13 - 16
Methode	17
Darstellungsweise der Ergebnisse	18 - 24
Auswertung und Ergebnisse	25 - 38
Besprechung	39 - 45
Zusammenfassung	46 - 47
Literaturverzeichnis	48 - 54

Einleitung

Die Unterscheidung der Blutleukocyten erfolgt gewöhnlich nach morphologischen Merkmalen, die die Zellen im gefärbten Präparat aufweisen. Während die Granulocyten durch spezifisch anfärbbare Körnchen im Cytoplasma leicht zu differenzieren sind, können Lymphocyten und Monocyten oft nur schwer auseinandergehalten werden. Besonders die Lymphocyten weisen wenig charakteristische Merkmale auf. Dieser Zelltyp, der meist mit rundlichem Zellkern vorkommt, bietet dadurch jedoch den Vorteil, die Kerngröße mittels Bestimmung des Kerndurchmessers feststellen zu können. Die Rundkernigkeit gestattet den Rückschluß vom Kerndurchmesser auf das Kernvolumen. Damit gewinnt man ein Unterscheidungsmerkmal innerhalb der als Lymphocyten bezeichneten Zellgruppe. Nachdem Kernmessungen an den Lymphocyten klinisch gesunder Hunde bereits vorlagen, wurde mir die Aufgabe gestellt, die Kerne von Lymphocyten kranker Hunde auszumessen und die Ergebnisse mit den bei gesunden Hunden gewonnenen zu vergleichen.

Schrifttum

Unter den Zellen, die regulär im B l u t vorkommen, findet sich ein Zelltyp, der durch einen rundlichen Kern gekennzeichnet ist und im Verhältnis zur Kerngröße relativ wenig Cytoplasma besitzt. Bei den üblichen Färbungen der Blutzellen (Giemsa, Pappenheim, Wright u.a.) nimmt der Kern einen kräftig rötlichen Farbton an, während das Cytoplasma sich deutlich blau anfärbt. Zellen dieser Art werden als L y m p h o c y t e n bezeichnet und werden durch die genannten Merkmale von den übrigen Blutzellen abgegrenzt.

Im G e w e b e finden sich jedoch auch Zellen anderer Art, die dem genannten Zelltyp morphologisch ähnlich sind. In Präparaten mancher Gewebe, die solche Formen neben Lymphocyten enthalten, kann die Differenzierung der Lymphocyten daher schwierig sein. Dies ist besonders in histologischen Schnittpräparaten der Fall, da die Zellen hier wegen der Fixierungsart wesentlich kleiner erscheinen als im Blutausstrich. Die Entstehung der Lymphocyten erfolgt im sog. lymphatischen Gewebe. Wegen der erwähnten Schwierigkeiten ist es bisher nicht gelungen, die Generationsfolge der Lymphocyten anhand einwandfrei voneinander unterscheidbarer Zelltypen festzulegen, wie dies bei anderen Zellarten möglich ist. Die unterschiedlichen Meinungen der Autoren spiegeln sich in den Bezeichnungen für die einzelnen Reifungsstufen des Lymphocyten wieder.

Morphologie

Im folgenden wird zunächst die Morphologie der B l u t lymphocyten anhand des Schrifttums näher erörtert.

Über die G r ö ß e der Lymphocyten im Blutausstrich des Menschen, gemessen am Durchmesser, finden sich u.a. folgende Angaben (in µ):

UNDRITZ	(1949)	9 - 12
HERNBERG	(1953)	11,7 ± 1,1
ALBRITTON	(1955)	6 - 14
HEILMEYER & BEGEMANN	(1955)	im Mittel 8
BRAUNSTEINER	(1959)	6 - 16

Von zahlreichen Autoren werden die Blutlymphocyten in große und kleine Lymphocyten unterteilt. HERNBERG (1953) und BRAUNSTEINER (1959) geben übereinstimmend als Durchmesser für die kleinen Lymphocyten 6,2 bzw. 6,5 bis 9 µ und für die großen 9 - 19 µ an. Auch bei den Lymphocyten des Hundes unterscheidet WIRTH (1950) kleine Lymphocyten von 10,2 (6,6 - 11,0) und große Lymphocyten von 14,6 (12,1 - 19,8) µ Durchmesser. Danach sind die Lymphocyten des Hundes im Durchschnitt größer als beim Menschen.

Die Beurteilung der Größe einer Zelle nach dem Durchmesser im Blutausstrich muß unter Berücksichtigung der artefiziellen Bedingungen erfolgen. Zellen nahe dem Rand des Ausstriches sind meist flacher ausgebreitet und erscheinen daher größer als Zellen, die mehr in der Mitte liegen. Hier trocknet der Ausstrich wegen der dickeren Schicht später als am Rande, die Zellen haben deshalb vor dem Absterben noch Zeit, sich

kugelig zusammenziehen. Der Cytoplasmasaum ist an solchen Zellen schmaler und intensiver gefärbt als in den Randpartien des Ausstriches (NIEPAGE, 1961). Selbst an den Zellkernen der Lymphocyten konnten TAKEDA & NAHAI (1951) nachweisen, daß der Durchmesser in den dichten Partien kleiner war als am Rande ($\bar{x}$ = 5,82 ; bzw. 9,26).

Der **K e r n** der Lymphocyten nimmt den größten Teil der Zelle ein. Nach HITTMAIR (1957) beträgt seine Masse das Doppelte des Cytoplasmas. SCHULTEN (1957) gibt die Größe des Kernes mit 9/10, BRAUNSTEINER (1955) mit 4/5 des Zellvolumens an.

Der Lymphocytenkern ist vom Cytoplasma deutlich abgesetzt und hat meist eine rundliche, selten jedoch kreisrunde Form (SCHULTEN, 1948). Häufig erkennt man an einer Seite eine kleine Eindellung. Auf Grund von Beobachtungen an überlebenden Zellen nehmen STOBBE (1960) und HANSEN (1956) an, daß die Lymphocyten im Ruhestadium in der Regel einen nierenförmigen Kern besitzen. Sie halten, wie auch WEICKER (1961), das Vorherrschen der rundlichen Kernform im Blutausstrich für eine Folge der Fixation. TOCANTINS (1961) erklärte nach Untersuchungen am Elektronenmikroskop die Eindellung als die Berührungsstelle von Kernmembran und Centrosom.

Im nach PAPPENHEIM gefärbten Blutausstrich nimmt der Lymphocytenkern einen rötlich-violetten Farbton an und läßt eine mehr oder weniger deutliche **C h r o m a t i n - s t r u k t u r** erkennen. Sie wird als grob und dicht, streifig-retikulär oder klumpig-balkig beschrieben. In

manchen Zellen ähnelt sie der sog. Radspeichenstruktur. Die Kernstruktur ist ein wesentliches Kriterium des Funktionsstadiums einer Zelle. Je älter die Zelle ist, desto dichter wird das Chromatin, desto dunkler färbt es sich an. Eine grob-balkige, evtl. radspeichenähnliche Zeichnung, verbunden mit einer stärkeren Anfärbbarkeit des Kernrandes wird von SCHLEIP & ALDER (1949) als Zeichen der Alterung der Zelle gedeutet.

Demgegenüber sind N u k l e o l e n , die sich als rundliche, mehr bläulich angefärbte Bezirke im Kern zeigen können, ein Merkmal der Jugendlichkeit, das auf eine noch vorhandene Teilungsfähigkeit der Zelle hinweist. Bei der üblichen Färbung sind Nukleolen allenfalls in wenigen, meist großen Lymphocyten erkennbar. Gelegentlich treten sie an gequetschten Kernen hervor (SCHLEIP & ALDER, 1949; HERNBERG, 1953; SCHULTEN, 1957). RIND (1958) sah in großen Lymphocyten mit dem Phasenkontrastmikroskop stets 1 - 2 nukleolenähnliche Verdichtungen, nicht jedoch in den kleinen Lymphocyten. HEILMEYER (1957) fand mit einer besonderen Technik in den Blutlymphocyten meist mindestens ein Kernkörperchen; in 4 - 6% der Lymphocyten zwei und in 0,5% der Zellen drei Nukleolen. Lediglich in 1% der Lymphocyten ließ sich kein Kernkörperchen nachweisen. Kernquellungen, Abschnürungen von Chromatinkörnchen sind als Alters- bzw. Abbaufolgen zu werten (FRANKE, 1954), ebenso das Auftreten einer perinukleären Granulation, deren Bedeutung bisher unklar ist (HEILMEYER, 1957). Dagegen gelten mehrkernige (polyploide) Zellen, atypisch

geformte Zellkerne, wie z. B. die bohnen- oder nierenförmigen Rieder-Typen, als Ausdruck von Reifungsstörungen (RIED, 1958).

Das C y t o p l a s m a des Lymphocyten ist basophil und färbt sich daher mit den genannten Färbemethoden hellblau bis dunkelblau an. Es ist entweder rings um den Kern herum oder nur einseitig vom Kern zu erkennen. Lymphocyten, deren Cytoplasma so gering ist, daß es im Ausstrich nicht wahrnehmbar ist, werden als nacktkernig bezeichnet. In Kernnähe sieht man häufig eine Aufhellung des Cytoplasmas (Halo lymphaticus; SCHLEIP & ALDER 1949). Der Grad der Basophilie hängt außer von den bereits erwähnten präparativen Einwirkungen, vom Funktionsstadium, bzw. vom Reifegrad der Zelle ab. Das Cytoplasma der kleinen Lymphocyten des Menschen wird als in der Regel kräftig blau, das der großen als blaßblau beschrieben.

Einige Lymphocyten enthalten im Cytoplasma azurophile G r a n u l a , die einen dunkel-violetten Farbton annehmen. Sie haben beim Menschen einen Durchmesser von 0,3 - 0,6 µ und sind einzeln oder zu mehreren in der Nähe des Kerns gelagert. Beim Menschen kommen nach SCHULTEN (1957) in etwa 10% der Lymphocyten azurophile Granula vor. Demgegenüber gibt BEGEMANN (1951) eine Häufigkeit von 30 - 50% an. GLEISS & SPARRER (1952) sahen nach Injektion von Antigen eine Zunahme der Lymphocyten mit azurophilen Granula von 33 auf 60%. Beim Hund fand SCHERMER (1954) nur selten Lymphocyten mit Granula. Durch eine besondere Färbung sind von ALTMANN & SCHRIDDE stäbchenförmige Einschlüsse in Lymphocyten des Menschen

nachgewiesen worden. Diese sog. ALTMANN - SCHRIDDE - Granula galten ursprünglich als spezifisch für Lymphocyten, wurden jedoch später auch in Monocyten gefunden (HEILMEYER, 1957; SCHULTEN, 1957). GALL beschrieb 1936 Vakuolen, die mit Neutralrot, im Dunkelfeld oder im Phasenkontrast nachweisbar sind, von denen HEMPELMANN & KNOWLTON (1953) annehmen, daß sie in Beziehung zum Golgi-Apparat stehen. Weiter werden " Glanzkörner " im Cytoplasma der Lymphocyten erwähnt, die nur selten, bei Leberparenchymschäden jedoch häufiger zu finden sind (RIND, 1958; STOBBE, 1960). Gelegentlich sind auch Mitochondrien durch Azurfarbstoff als feine Stäubchen darstellbar.

Karyometrik :

Nachdem JAKOBJ in Untersuchungen, die die Arbeiten von HERTWIG (1903, 1908) und HEIDENHAIN (1907, 1912, 1914, 1925) fortsetzten, festgestellt hatte, daß Wachstum und Teilung der Zellen in ganz bestimmten Volumenrelationen erfolgt, sind in neuerer Zeit auch an den Kernen von Lymphocyten häufiger Kernmessungen durchgeführt worden.

JAKOBJ (1925, 1927, 1931, 1935, 1942) fand zuerst an Leberzellen, die wegen ihres im Präparat rund erscheinenden Zellkernes für die Berechnung des Kernvolumens aus dem Durchmesser besonders geeignet sind, heraus, daß vorwiegend Kerne auftraten, deren Volumina im Verhältnis 1 : 2 : 4 : 8 u.s.w. standen. Diese Beziehung der Kernvolumina zueinander folgt aus der Halbierung der Kerne

bei der Zellteilung und dem rhythmischen Wachstum durch Volumenverdoppelung. Diejenige Kernklasse, die am häufigsten gefunden wurde, nannte JAKOBJ die Regelklasse. Als Grundklasse bezeichnete er das Kernvolumen, das im Embryonalstadium bei der betreffenden Zellart gefunden wurde. JAKOBJ (1937) führte auch Kernmessungen an Lymphocyten des Menschen durch, konnte aber das Gesetz der Verdoppelung nicht überzeugend nachweisen. VORBECK (1935) fand in Keimzentren des lymphatischen Gewebes drei Kernklassen, deren Volumina sich wie 1 : 2 : 4 verhielten. Eine weitere Kernklasse ordnete sich dieser Reihe nicht ein; VORBECK nahm an, daß es sich dabei um geschrumpfte Zellen handelt. KRAUSE (1935) und MONDRY (1937) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Beide beobachteten sowohl im lymphatischen Gewebe, als auch in den Keimzentren von Tonsillen und Lymphknoten das Vorkommen von drei Kernklassen.

FREERKSEN (1933) fand durch Messungen an Blutlymphocyten bei Kaninchen drei Kernklassen heraus, bei Meerschweinchen zwei und eine nur gering vertretene dritte.

In jüngerer Zeit sind von GRUNDMANN durch karyometrische Messungen und morphologische Differenzierung bei der Ratte (1957,1958), anderen Nagetieren (1958) und am Menschen (1952, 1958,1959,1960) zwei Lymphocytenarten mit unterschiedlichen Entwicklungsorten erkannt worden. Er unterscheidet Sinuslymphocyten und Follikellymphocyten und fand für jede dieser beiden Zellarten sechs unterscheidbare Typen, davon drei, deren Kernvolumen den JAKOBJschen Gesetz folgen, während die anderen drei mit je einer dieser isometrisch waren.

LENNERT & RIEBELE (1958) haben an Lymphknoten von Menschen bei verschiedenen Krankheiten Kernmessungen vorgenommen. Sie fanden sechs dem JAKOBJschen Gesetz folgende Kernklassen, die sie als basophile Stammzellen (K 4), große Germinoblasten (K 2), mittlere Germinoblasten (K 1), kleine Germinoblasten (K 1/2), junge Lymphocyten (K 1/4) und alte Lymphocyten (K 1/8) bezeichneten. Daneben kam eine Kernklasse vor, deren Größe ihrer Meinung nach durch funktions- und schädigungsbedingte Polyploidierung bestimmt war und sich nicht in die Proportionen einpassen ließ.

GRUNDMANN (1959) konnte bei seinen Analysen diese oben angeführten Kernklassen nur bei gesonderter Messung der einzelnen Kerntypen feststellen. Maß er aber alle Zellen einer Reifungsgruppe, so entstanden Kurven ohne klare Verdoppelungsrhythmik. Diese Maskierung der Kernklassen erklärte er durch funktionsbedingte Volumenreaktion. Zwischenwerte, welche die klare Rhythmik beeinträchtigen, sind danach durch interphasische Wachstumsstadien zu erklären. Ähnlich hatten sich schon 1937 TANNER u. HINTZSCHE geäußert, indem sie von der JAKOBJschen Regel abweichende Resultate als Folge der funktionellen Beanspruchung der Zelle deuteten.

Im veterinärmedizinischen Schrifttum liegen nur wenige Arbeiten über Messungen an Lymphocytenkernen vor. v. MICKWITZ & NIEPAGE bestimmten 1959 an Lymphocytenkernen des Rindes lediglich den jeweils größten Durchmesser und stellten fest, daß mit der Vermehrung der Lymphocytenzahl im Blut ein häufigeres Auftreten von großen Lymphocyten einherging. SCHULZE (1962) kam durch Berechnung def Kernvolumina von Blutlympho-

cyten des Hundes zu der Feststellung, daß signifikante Mittelwertunterschiede der Lymphocytenvolumina von Hund zu Hund bestehen können. Hunde mit durchschnittlich niedrigen Lymphocytenkernvolumina hatten höhere Hämatokritwerte als Hunde mit mehr großkernigen Lymphocyten. In dieser Arbeit wird auf Grund der Häufigkeitsverteilungen der Kernvolumina die Vermutung geäußert, daß sich die Lymphocyten des Hundes aus zwei verschiedenen Zelltypen zusammensetzen.

Die Frage nach der Generationsfolge der Lymphocyten (Abstammungstheorie) hat durch die Möglichkeit, auf Grund der Kernvolumenrelationen zusammengehörige Generationsstufen zu erkennen, neue Aktualität bekommen. Es wird immer wahrscheinlicher, daß die sog. Lymphocyten keine einheitliche Zellart darstellen, sondern mindestens zwei verschiedene Zelltypen repräsentieren. Da sich das Thema meiner Arbeit auf die im Blut vorkommenden Lymphocyten beschränkt, aus deren Untersuchungen allein ein Aufschluß über die Generationsfolge nicht zu erhalten ist, sollen die verschiedenen Abstammungstheorien hier im einzelnen nicht dargestellt werden. Bisher hat sich zu diesem Problem keine einheitliche Meinung durchgesetzt.

Material

Die Messungen erfolgten an Präparaten von Hunden, die Patienten der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin waren. Eine besondere Auswahl nach Art der Krankheit wurde nicht getroffen. Es ergab sich, daß für 5 Patienten ein gemeinsames Symptom der erhöhte Harnstoffwert im Blut war, 4 Hündinnen kamen wegen Pyometra in die Klinik.

Die Tiere im einzelnen :

6 Welsh-Hündin, 6 Jahre. Überweisung vom Kollegen. Das Tier war seit etwa 14 Tagen matt u. apathisch. Die Blutuntersuchung ergab eine hochgradige Anämie : Erythroc. : 2,2 Mill. ; Leukoc. 6,3 Tsd. Diffb. : -,2/-,1,56,11/20,10 ; BKS 120/154 Rücküberweisung nach Bluttransfusion.

24 Teckel-Hündin, 1 Jahr. Dem Patienten war wegen eines Milztumors, der mit hochgradiger Blutarmut verbunden war, die Milz vor eineinhalb Monaten exstirpiert worden. Als das untersuchte Präparat gewonnen wurde, erschien die Hündin bereits klinisch gesund : Erythroc. 5,7 Mill. ; Leukoc. 9,0 Tsd. Diffb. : -,19/-,-,28,29/8,16

51 Boxer-Rüde, 7 Jahre. Der Hund kam wegen Polydipsie und mäßiger Abmagerung zur Behandlung. Der Harnstoff betrug im Blut 180 mg% Erythroc. 6,8 Mill. ; Leukoc. 11,4 Tsd. Diffb. : -,-/-,-,60,13/17,10

Die Urämie ging in der Folge zurück, der Patient wurde gebessert entlassen.

60 Bastard-Hündin, 10 Jahre.

Überweisung vom Kollegen. Das Tier wurde wegen der Vergrößerung eines Lymphknotens vorgestellt. Die Lymphknotenpunktion ergab keinen Anhalt für Lymphadenose (Reizlymphknoten).

Erythroc. : 6,7 Mill. ; Leukoc. 7,4 Tsd.

Diffb. : -,11/-,-,39,22/14,14 ; BKS 4/13

Rücküberweisung.

81 Neufundländer-Hündin, 8 Jahre.

Eingestellt wegen Pyometra.

Erythroc. : -,-/4,42,38,2/7,7 ; BKS 90/120

Der Patient starb 3 Tage nach der Operation.

82 Drahthaarterrier-Hündin, 8 Jahre.

Eingestellt wegen Pyometra.

Erythroc. : 6,4 Mill. ; Leukoc. 13,4 Tsd.

Diffb. : -,3/-,-,62,5/26,4 ; BKS 8/22

Nach der Operation geheilt entlassen.

83 Bastard-Hündin, Alter unbekannt.

Eingestellt wegen Pyometra.

Erythroc. : 6,0 Mill. ; Leukoc. 21,4 Tsd.

Diffb. : -,5/1,24,36,3/11,20 ; BKS 54/30

+ 5 Normoblasten /100

98 Irish-Setter-Rüde, 7 Jahre.

Vergrößerung von Lymphknoten. Die Punktion ergab ein blutiges, sonst zellarmes Punktat; Diagnose ungeklärt, kein Anhaltspunkt für Lymphadenose.

Erythroc. : 5,6 Mill. ; Leukoc. 7,3 Tsd.

Diffb. : -,3/-,4,63,3/10,17 ; BKS 82/108

Weiterer Verlauf unbekannt.

104 Wachtel-Bastard-Hündin, 8 Jahre.

Eingestellt wegen Pyometra.

Erythroc. : 5,4 Mill. ; Leukoc. 8,2 Tsd.

Diffb. : -,1/8,32,4,-/32,23 ; BKS 80/100

Nach der Operation entlassen.

204 Pudel-Rüde, 8 Jahre.

Vorgestellt mit Orchitis. Harnstoff 200 mg%.

Erythroc. : 5,8 Mill. ; Leukoc. 27,0 Tsd. BKS 119/123

Nach der Operation (mit 75 mg% Harnstoff) entlassen.

207 Deutscher Schäferhund-Rüde, Alter unbekannt.

Eingeliefert mit 110 mg% Harnstoff.

Erythroc. : 8,3 Mill. ; Leukoc. 12,3 Tsd.

Diffb. : -,3/-,-,53,19/11,14 ; BKS 61/93

Weiteres Schicksal unbekannt.

215 Foxterrier-Hündin, 7 Jahre.

Die Hündin kam mit Pyometra in urämischem Zustand in die Klinik. Harnstoff 250 mg%.

Diffb. : -,5/-,-,81,8/2,4 ; BKS 86/115

Euthanasie.

217 Bastard-Rüde, 8 Jahre.

Der Patient litt an Diabetes mellitus; Blutzucker zeitweise über 400 mg%; Harnstoff 100 mg% ;

Erythroc. : 3,8 Mill. ; Leukoc. 35,0 Tsd.

Diffb. : -,-/-,-,70,26/-,4 ; BKS 146/150

Mit Insulin-Therapie entlassen.

231 Deutsche Schäferhündin, 9 Jahre.

Das Tier kam mit Vergrößerung sämtlicher palpabler Lymphknoten in die Klinik. Die Präparate stammten von 3 verschiedenen Tagen :

16. 4. : Erythroc. : 7,0 Mill. ; Leukoc. 10,1 Tsd.
Diffb. : -,-/-,-,25,25/28,22 ; BKS 2/27
+ 21 abnorme Rundzellen

24. 4. : Erythroc. : 5,5 Mill. ; Leukoc. 17,4 Tsd.
Diffb. : -,1/-,1,56,15/16,11 ; BKS 41/61
+ 3 abnorme Rundzellen

30. 4. : Erythroc. : 5,6 Mill. ; Leukoc. 17,2 Tsd.
Diffb. : -,4/-,-,43,28/14,11 ; BKS 23/42

Die serologischen Untersuchungen machten eine Listerellainfektion wahrscheinlich. Heilung.

Methodik

Die Ausmessung der Lymphocytenkerne erfolgte in Präparaten, die aus dem Leukocytensaum des WINTROBE-Hämatokrit gewonnen waren. Nach dem Zentrifugieren des mit Heparin ungerinnbar gemachten Blutes befindet sich über der Erythrocytenschicht ein mehr oder weniger schmaler rötlich-grauer Saum, der vorwiegend aus den Leukocyten des Blutes besteht. Nach Absaugen des darüber befindlichen Plasmas wurde diese mittlere Schicht des Hämatokrit in eine Kapillare aufgezogen, auf einen Objektträger ausgeblasen und wie ein Blutausstrich ausgestrichen und gefärbt (PAPPENHEIM-Färbung). Der Vorteil gegenüber dem gewöhnlichen Blutausstrich besteht in einer Anreicherung der weißen Blutkörperchen und damit auch der Lymphocyten, auf die es für meine Untersuchungen ankam.

Zur Messung diente ein Okularschraubenmikrometer der Fa. Carl Zeiss, als Objektiv eine Ölimmersion mit 100 facher Vergrößerung. Ein Teilstrich auf der Meßtrommel entsprach 0,1 µ im Präparat. Es wurden nur Gesichtsfelder ausgewertet, in denen die Zellen nicht zu dicht, sondern einzeln nebeneinander lagen. Innerhalb der danach ausgewählten Gesichtsfelder wurden sämtliche rundkernigen Zellen für die Messungen berücksichtigt. An jedem Zellkern wurde der größte und der dazu senkrecht stehende Durchmesser bestimmt. Daraus wurde für jeden Zellkern das Volumen über die Formel des Rotationsellipsoides berechnet:

$V = 4/3 \pi r^2 R$ (V=Volumen; r=kl. Radius; R=gr. Radius)

$V = 0{,}524\ Dd^2$ (d=kleiner Durchmesser; D=gr. Durchmesser der Zelle)

Die Darstellungsweise der Ergebnisse

Um eine Vorstellung von den Mengenverhältnissen der ermittelten Kernvolumina zu gewinnen, wurde das Material an Meßergebnissen als Häufigkeitsverteilung dargestellt. Üblich ist die Zusammenfassung in Größenklassen, die den gleichen Umfang haben und in zunehmender Größenordnung auf einer Abszisse eingetragen sind. Als Ordinate wird über jeder Klasse die Anzahl der in diesem Größenbereich gefundenen Kernvolumina eingezeichnet. Durch Verbindung der Ordinatenendpunkte entsteht die a r i t h m e t i s c h e H ä u f i g k e i t s v e r t e i l u n g. Das JAKOBJsche Gesetz des rhythmischen Kernwachstums durch Verdoppelung des Kernvolumens bewirkt, daß Zellkerne auftreten, deren Volumina sich wie 1 : 2 : 4 : 8 u.s.w. verhalten. Die biologische Variabilität und der methodisch bedingte Meßfehler haben zur Folge, daß diejenigen Zellkerne, die gemeinsam zu einer dieser Kernklassen gehören, in der arithmetischen Häufigkeitsverteilung insgesamt als sog. N o r m a l v e r t e i l u n g (Glockenkurve nach GAUSS-LAPLACE, Zufallsverteilung) in Erscheinung treten. Der Gipfel dieser Kurve entspricht dem mittleren Volumen dieser Kernklasse und liegt über demjenigen Abszissenpunkt, der den für die Kernklasse typischen Volumenbereich angibt. Die variabilitätsbedingten Nebenwerte nehmen in ihrer Häufigkeit beiderseits des Gipfels mehr oder weniger symmetrisch ab.

Besteht das untersuchte Material aus Zellkernen mehrerer Kernklassen, so liegen bei der arithmetischen Einteilung

der Abszisse die Fußpunkte unter den Maxima der einzelnen Normalverteilungen wegen des Größenverhältnisses 1 : 2 : 4 : 8 u.s.w. in zunehmend größerem Abstand voneinander.

Die biologische Variabilität steht im bestimmten Verhältnis zur Kerngröße; bei großen Zellkernen ist sie absolut genommen größer als bei kleinen. Deshalb nimmt die Breite der Normalverteilungen mit der Kerngröße zu. Auch bei gleicher Häufigkeit der Kerne in jeder Kernklasse nehmen die Gipfel der Normalverteilungen an Höhe dementsprechend ab.

Durch Überlagerung der einzelnen Normalverteilungen entsteht - eine ausreichende Zahl von Meßergebnissen vorausgesetzt - bei der arithmetischen Darstellung in der Regel eine Häufigkeitsverteilung ("Interferenzkurve"), die zunächst steil ansteigt und zu den größeren Werten hin allmählich abfällt. Derartige Verteilungskurven sind schwer zu deuten. Für die speziellen Bedingungen des JAKOBJschen Gesetzes entwickelte deshalb HINTZSCHE (1945) eine Darstellungsweise, die biologisch Gleichwertiges gleichartig wiedergibt.

Auf der Abszisse werden die Fußpunkte unter den Maxima der Normalverteilungen in gleichen Abstand voneinander gebracht. Der Abhängigkeit von Variabilität und Kerngröße wird Rechnung getragen, indem der Variabilitätsbereich von Kernklasse zu Kernklasse verdoppelt wird; bei der HINTZSCHE-Verteilung resultiert daraus für jede Kernklasse ein gleichgroßer Abszissenabschnitt.

In der Mitte dieses Bereiches wird entsprechend der Häufigkeit der in diesen Bereich fallenden Kernvolumina eine Ordinate errichtet. So entstehen anstelle der Gipfel der Normalverteilungen (arithmetische Darstellung) Maxima, die gleich hoch sind, wenn die Kernklassen durch die gleiche Anzahl von Kernvolumina repräsentiert werden. Bei der Abszissenteilung nach HINTZSCHE wird der Raum zwischen zwei benachbarten Kernklassen durch drei Abschnitte ausgefüllt, die sich in die Teilung einfügen (s.u.). Sie umfassen geringere Abschnitte als sie für die JAKOBJschen Kernklassen vorgesehen sind, reichen jedoch aus, um Unregelmäßigkeiten im untersuchten Material aufzudecken.

In Abbildung 1 sind die arithmetische und die Abszisseneinteilung nach HINTZSCHE einander gegenübergestellt.

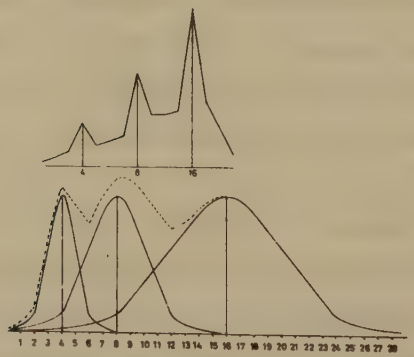


Abb. 1: Häufigkeitsverteilung; unten arithmetisch, oben nach HINTZSCHE dargestellt.

Sie zeigt unten drei sich überlagernde Normalverteilungen, deren Maxima dem JAKOBJschen Gesetz entsprechen, gestrichelt die daraus resultierende Interferenzkurve sowie darüber die entsprechende Darstellung nach HINTZSCHE. Es muß hervorgehoben werden, daß die HINTZSCHE-Verteilung darauf angelegt ist, an vornerbestimmten Stellen Maxima zu liefern. Würde z. B. ein Untersuchungsmaterial von jeder vorkommenden Zellkerngröße gleich viel enthalten, die Häufigkeitsverteilung in der arithmetischen Darstellung also horizontal verlaufen, so ergäbe sich in der Darstellung nach HINTZSCHE ein Bild wie es Abbildung 2 zeigt.

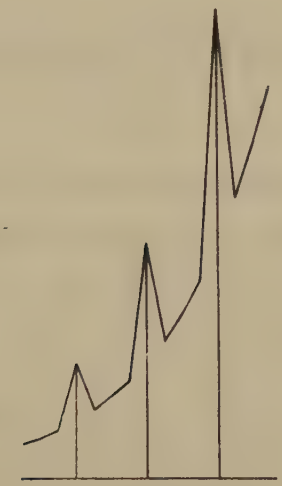


Abb. 2: HINTZSCHE-Verteilung bei gleicher Häufigkeit aller Größenklassen.

Nicht das Auftreten von Gipfeln an bestimmten Stellen ist in erster Linie kennzeichnend für das untersuchte Material, sondern das Höhenverhältnis der Gipfel zueinander (in Abb. 2, 1 : 2 : 4) und evtl. das Auftreten von unsymmetrischen Hauptgipfeln oder von Zwischengipfeln. In einem Material, das dem JAKOBJschen Gesetz folgt, sind Zwischengipfel nicht zu erwarten, wenn die HINTZSCHE-Verteilung auf e i n e der vorkommenden Kernklassen ausgerichtet ist.

Um das Verfahren praktisch anwenden zu können, muß zunächst aus dem vorhandenen Zahlenmaterial die mittlere Kerngröße e i n e r , in der Regel der am häufigsten vertretenen Kernklasse ermittelt werden. Dazu geht man zweckmäßig von einer arithmetischen Verteilung des Materials aus, bei der, um nichts zu präjudizieren, die Abszisseneinheit möglichst klein gewählt wird. Aus den Kernvolumina des am dichtesten besetzten Abschnittes dieser Häufigkeitsverteilung wird nach WILFINGSEDER (1948) das geometrische Mittel gebildet. Es dient als Grundlage für die Berechnung der einzelnen Abszissenabschnitte nach HINTZSCHE.

Das geometrische Mittel wird durch 2, durch 4, durch 8 u.s.w. geteilt und mit 2, mit 4, mit 8 u.s.w. multipliziert, um die Klassenmitten der übrigen nach JAKOBJ zu erwartenden Kernklassen zu finden. Damit sind die Kernvolumina bestimmt, mit denen die Fußpunkte unter den Maxima bezeichnet werden. Der Abszissenbereich muß sich so weit erstrecken, daß das kleinste und das größte der gefundenen Kernvolumina darin unterzubringen sind.

Die Größe der Teilstücke von Klassenmitte bis Klassenmitte

($\overline{AB}$; Abb. 3) wird aus den Verhältnissen

$$0{,}5 : a = a : b = b : c = c : 1{,}0$$

berechnet. Es ergibt sich a = 0,59; b = 0,71; c = 0,84; die Summe der Teilstücke beträgt 3,64.

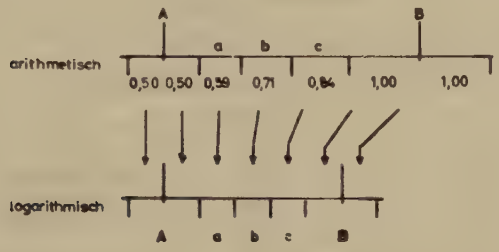


Abb. 3: Ableitung der Abszisseneinteilung nach HINTZSCHE aus der arithmetischen Abszisseneinteilung.

Es gilt:

$\overline{AB} = 3{,}64$; $\frac{1}{\overline{AB}} = \frac{1}{3{,}64} = 0{,}275$; $\frac{\overline{AB}}{\overline{AB}} = 0{,}275\ \overline{AB} = 1$

Für die folgenden Bereiche $\overline{BC}$, $\overline{CD}$ u.s.w. entsprechend

$0{,}275\ \overline{BC} = 1$; $0{,}275\ \overline{CD} = 1$ u.s.w.

Bezogen auf den Bereich $\overline{AB}$ entspricht dem Teilstück

0,50.....0,50 x 0,275 $\overline{AB}$ = 0,138 $\overline{AB}$

0,59.....0,59 x 0,275 $\overline{AB}$ = 0,163 $\overline{AB}$

0,71.....0,71 x 0,275 $\overline{AB}$ = 0,195 $\overline{AB}$

0,84.....0,84 x 0,275 $\overline{AB}$ = 0,231 $\overline{AB}$

1,00.....1,00 x 0,275 $\overline{AB}$ = 0,275 $\overline{AB}$

In derselben Weise sind die Teilstücke für die anschließenden Bereiche $\overline{BC}$, $\overline{CD}$, $\overline{DE}$ u.s.w. zu berechnen. Um d[illegible]ere

Grenze jedes Teilabschnittes zu erhalten summiert man, ausgehend vom Mittelwert der kleinsten Kernvolumenklasse, fortlaufend.

Rechenbeispiel

Grundlage: 380 Klassenmitten

23,75
47,50
95,00
190,00
380,00
760,00
1520,00

Berechnung der oberen Klassengrenzen:

	(23,7)	Klassenmitte
+	3,3	
	27,0	obere Klassengrenze
+	3,9	
	30,9	obere Klassengrenze
+	4,6	
	35,5	obere Klassengrenze
+	5,5	
	41,0	obere Klassengrenze
+	6,5	
	(47,5)	Klassenmitte
+	6,5	
	54,0	obere Klassengrenze
+	7,7	
	61,7	obere Klassengrenze
+	9,2	
	70,9	obere Klassengrenze

u.s.w.

Berechnung der Teilstücke:

23,75 x 0,138 = 3,3
x 0,163 = 3,9
x 0,194 = 4,6
x 0,231 = 5,5
x 0,275 = 6,5
47,50 x 0,138 = 6,5
x 0,163 = 7,7
x 0,194 = 9,2

u.s.w.

Auswertung und Ergebnisse

Zuerst wurde das Gesamtmaterial an Lymphocytenkernvolumina ohne Rücksicht auf die einzelnen Patienten zusammengefaßt und in einer arithmetischen Häufigkeitsverteilung dem Gesamtmaterial von SCHULZE (klinisch gesunde Hunde) gegenübergestellt (Abbildung 4).

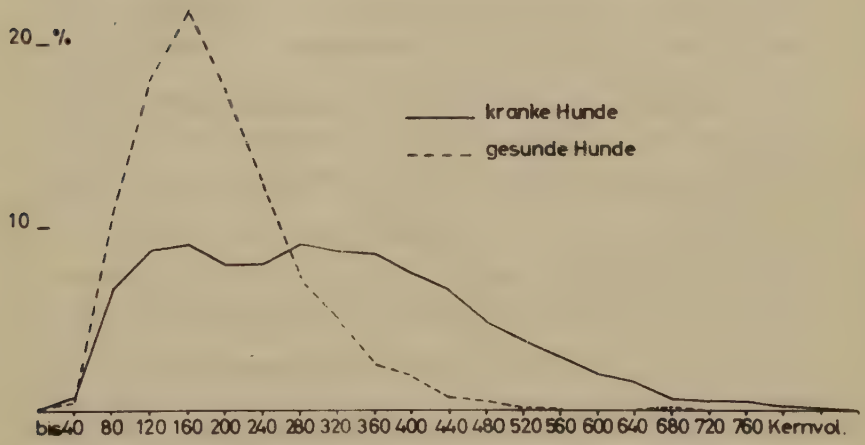


Abb. 4: Vergleich der Lymphocytenkernvolumina bei gesunden und kranken Hunden.

Die Verteilung der Volumina unseres Materials ist im ganzen flacher und erstreckt sich bis zu größeren Kernvolumina hin als das Vergleichsmaterial. Man erkennt, daß bei

den kranken Hunden größere Lymphocytenkernvolumina häufiger vorkamen als es bei den klinisch gesund erscheinenden der Fall war.

Die arithmetischen Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Patienten sind in Abbildung 5 zusammengestellt.

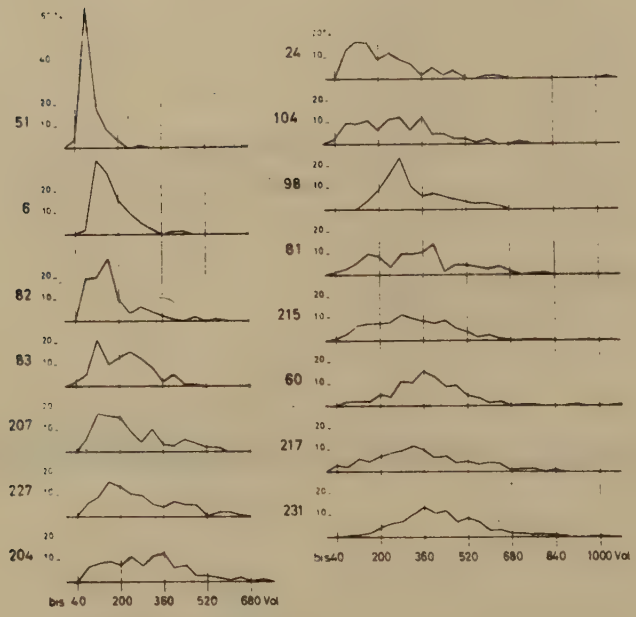


Abb. 5: Arithmetische Häufigkeitsverteilung der Lymphocytenkernvolumina bei den einzelnen Patienten.

Sie differieren z. T. deutlich voneinander. Während bei den Hunden 51 und 6 ein Gipfel über niedrigen Kernvolumina deutlich ist, tritt bei den Fällen 82, 207, 227, 24 eine Häufung niedriger Kernvolumina weniger deutlich hervor. Hund 98 hat einen ausgeprägten Gipfel über dem Volumen 280. Die anderen Fälle zeigen flache Häufigkeitsverteilungen, deren Gipfel, meist wenig hervorgehoben, über den größeren Kernvolumina auftreten.

Das Material von SCHULZE wurde von NIEPAGE (1964) mit Hilfe der Verteilung nach HINTZSCHE untersucht. Dabei zeigte sich, daß es trotz zahlreicher Versuche mit unterschiedlichen Regelklassen nicht möglich war, das Gesamtmaterial befriedigend darzustellen. Die bestmögliche Anpassung ergab sich bei Verwendung einer Regelklasse mit dem Kernvolumen 65. Es blieb jedoch ein Zwischengipfel im Bereich zwischen 130 und 260, so daß vermutet wurde, daß neben einer Zellart, die dem JAKOBJschen Gesetz mit den Volumina 65, 130, 260 ..... folgte, noch eine weitere vertreten war. Für diese Zellart wurde das Kernvolumen 190 als häufigstes festgestellt (Abbildung 8).

Am eigenen Material wurden zunächst für jeden Hund einzeln mittels einer arithmetischen Häufigkeitsverteilung, deren Klasseneinteilung der Meßgenauigkeit entsprach, also möglichst eng war, geprüft, welche Kerngrößen besonders häufig waren. Wegen der verhältnismäßig geringen Zahl der Kerne, die auf den einzelnen Hund entfielen, war nicht in allen Fällen eine sichere Entscheidung möglich.

In der folgenden Aufstellung sind die geometrischen Mittel

aus den am dichtesten besetzten Bereichen der Abszisse gebildet:

57(51)	124(82)	215(217)	99(85)	189(227)	320(204)
	124(207)	215(231)			349(81)
	125(6)	237(104)			356(60)
	133(24)	239(98)			
		254(215)			

Die Nummer des betreffenden Hundes ist in Klammern gesetzt. Die Anordnung macht deutlich, daß eine Häufung an bestimmten Stellen vorherrscht. Die linke Gruppe kommt der JAKOBJschen Reihe 65 : 130 : 260 , die rechte der Reihe 95 : 190 : 380 einigermaßen nahe. Da überdies zu vermuten ist, daß bei kranken Hunden die gleichen Lymphocytentypen auftreten wie bei gesunden, wurden die bei klinisch gesunden Hunden als geeignet ermittelten Kernvolumina 65 und 190 auch für die Analyse des Materials kranker Hunde zugrundegelegt.

In den Abbildungen 6 und 7 sind für jeden Hund die HINTZSCHE-Verteilungen mit der Grundlage 65 (links) und mit der Grundlage 190 bzw. 380 (rechts) nebeneinandergestellt. Die bessere Anpassung an die auf 65 basierte Einteilung zeigen die Hunde 51, 6, 82, 207, 24, 104, 98. Dagegen werden die Fälle 85, 227, 81, 215, 60, 217, 231 durch die HINTZSCHE-Verteilung auf der Basis 190 befriedigender dargestellt.

Eine HINTZSCHE-Verteilung, die das JAKOBJsche Gesetz rein wiedergibt, wird in keinem Fall erreicht, Zwischengipfel zwischen den provozierten Maxima, Verzerrungen der Hauptgipfel kommen mehrfach vor.

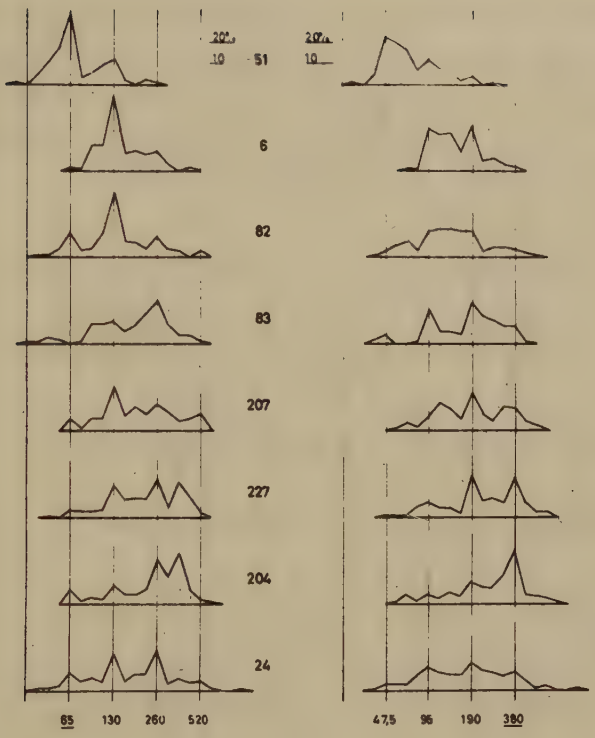


Abb. 6: Vergleich der HINTZSCHE-Verteilungen auf der Grundlage 65 und 190 für die einzelnen Fälle.

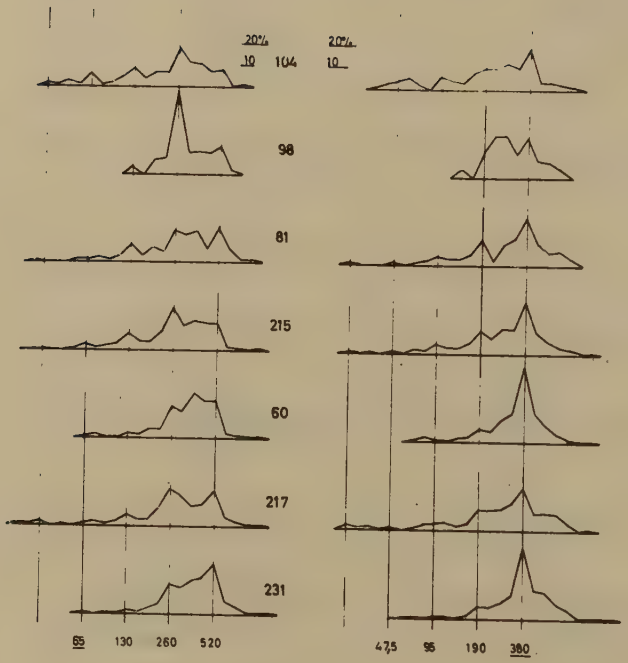


Abb. 7: Vergleich der HINTZSCHE-Verteilungen auf der Grundlage 65 und 190 für die einzelnen Fälle.

Um Zufallseinwirkungen infolge der pro Einzelfall relativ geringen Zahl an Messungen zu unterdrücken, wurde in Abbildung 8 das Gesamtmaterial entsprechend den beiden Grundwerten 65 und 190 nach HINTZSCHE dargestellt und mit dem Material von SCHULZE verglichen.

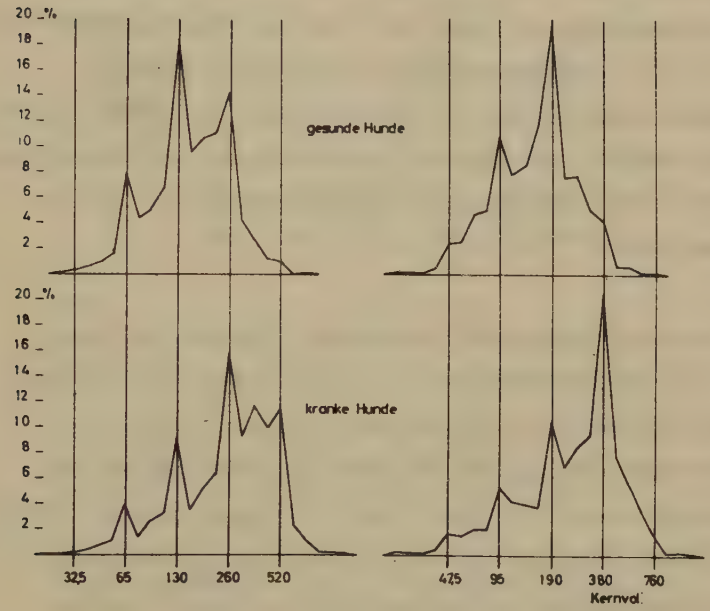


Abb. 8: Gegenüberstellung des Materials von SCHULZE (oben) mit dem eigenen (unten) in der Darstellung nach HINTZSCHE auf der Basis 65 (links) und 190 (rechts).

Hier zeigt sich deutlich, daß für die klinisch gesunden Hunde (Material SCHULZE) die Verteilung auf der Basis 65

die geeignetere ist. Zwar deutet sich der erwähnte Zwischengipfel im Bereich 130 - 260 an; im übrigen verläuft der Kurvenzug jedoch typisch. Werden dagegen die im Bereich 130 - 260 liegenden Kernvolumina durch die Regelklasse 190 erfaßt, so treten sie zwar als deutlicher Gipfel hervor, die Anpassung im ganzen ist jedoch recht unbefriedigend. Das Maximum über 380 hebt sich nicht deutlich hervor und zwei Zwischengipfel treten auf. Bei den kranken Hunden verhält es sich dagegen umgekehrt. Hier befriedigt die HINTZSCHE-Darstellung auf der Grundlage 190 besser als diejenige nach 65, bei der sich die Häufigkeit des Kernvolumens 380 als Gipfel zwischen den Kernklassen 260 und 520 bemerkbar macht.

Die weitere Untersuchung erstreckte sich auf die Frage, wie sich die Kernvolumina von Zellen, denen ein morphologisches Kriterium gemeinsam war, bei der Verwendung der beiden Grundlagen 65 und 190 nach HINTZSCHE darstellen. Als morphologische Merkmale wurden Cytoplasmamangel (Nacktkernigkeit), deutlich blaue Anfärbung des Cytoplasmas, grau-blaue Anfärbung des Cytoplasmas und das Vorkommen von azurophilen Granula registriert.
Im Gesamtmaterial waren nacktkernige Lymphocyten besonders häufig (n=1136). Die Kernvolumina dieser Zellen erstrecken sich über die gesamte Klassenskala. Es ist daher nicht überraschend, daß die HINTZSCHE-Verteilungen der nacktkernigen Lymphocyten fast identisch waren mit den entsprechenden Verteilungen des Gesamtmaterials. Auf eine

besondere Darstellung wird deshalb verzichtet.

Die Verteilung der Lymphocyten mit grau-blau angefärbtem Cytoplasma zeigt Abbildung 9 .

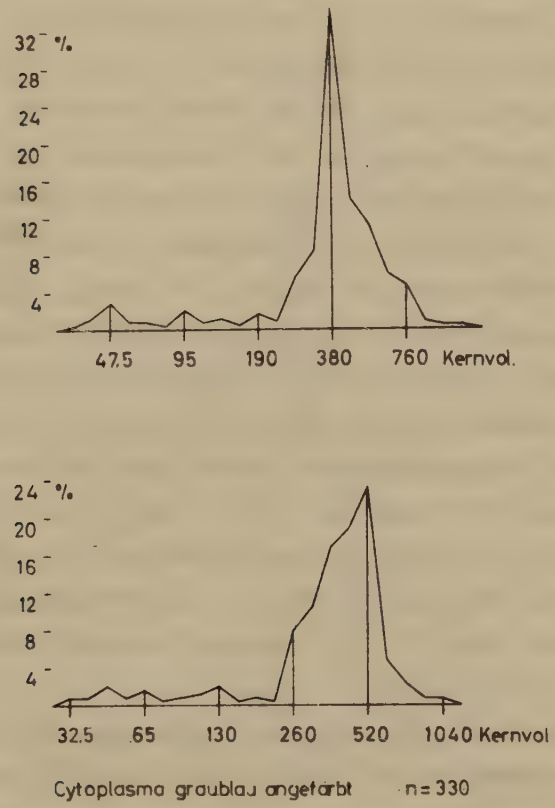


Abb. 9: HINTZSCHE-Verteilung der Kernvolumina bei Lymphocyten mit grau-blau angefärbtem Cytoplasma.

Die nach Kernklasse 65 ausgerichtete Verteilung (unten) entspricht den JAKOBJschen Verhältnissen nicht gut; ledig-

lich der Gipfel über der Volumenklasse 520 ist hervorgehoben, jedoch verzerrt durch die beträchtliche Häufigkeit der niedrigen Nebenklassen. Das auf Kernklasse 190 basierende Schema kommt der idealen Verteilung näher. Die niedrigen Kernklassen sind hier nur schwach besetzt, über 380 entsteht ein deutliches Maximum. In dieser Verteilung deuten sich jedoch die Kerngrößen im Bereich 260 und 520 (untere Verteilung) als Zwischengipfel an.
Für die Darstellung der Kernvolumenverteilung der Lymphocyten mit blau angefärbtem Cytoplasma (Abbildung 10) ist das HINTZSCHE-Schema mit der Basis 65 (unten) dagegen besser geeignet als das auf die Kernklasse 190 gegründete. Zwei Gipfel (über 260 und 520) heben sich hervor, die übrigen Klassen sind gering besetzt. Die Verteilung zeigt aber, daß zwischen den beiden Gipfeln noch Zwischengrößen in beträchtlicher Menge vorkommen. Kerne dieser Volumina bringen bei der Einteilung nach Kernklasse 190 (oben) den Gipfel über 380 zustande. Weil die Nachbarhäufigkeiten relativ groß sind, ist die Anpassung im ganzen jedoch nicht als gut zu bezeichnen.
Am deutlichsten wird der Unterschied bei den Lymphocyten mit azurophilen Granula. Hier ist die untere Darstellung mit der Basis 65 am wenigsten angemessen. Das typische Bild der HINTZSCHE-Verteilung für Zellen, die dem JAKOBJschen Gesetz folgen, kommt nicht heraus. Demgegenüber befriedigt das HINTZSCHE-Schema, das auf die Kernklasse 190 aufgebaut ist, nahezu vollkommen. Man erkennt, daß die meisten Kerne dieses Zelltyps der Kernklasse 380 angehören, ein geringer

Anteil fällt in die Klasse 190. Die Nachbarhäufigkeiten der Gipfel entsprechen der Erwartung bei einer Zellpopulation, die lediglich aus e i n e m , dem JAKOBJschen Gesetz folgenden Zelltyp besteht. (Abbildung 11)

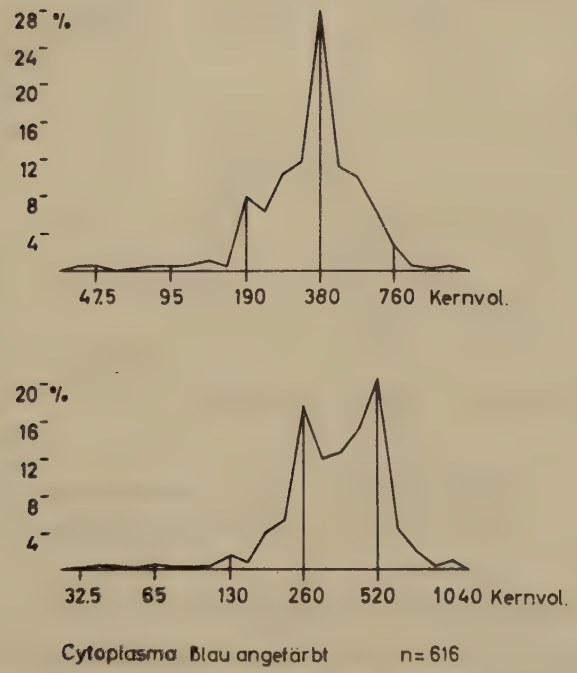


Abb. 10: HINTZSCHE-Verteilung der Kernvolumina bei Lymphocyten mit blau angefärbtem Cytoplasma.

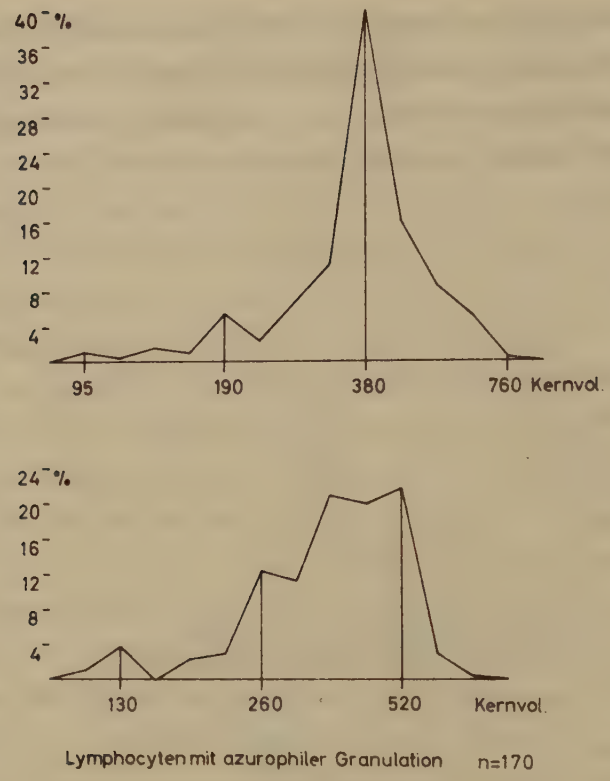


Abb. 11: HINTZSCHE-Verteilung der Kernvolumina von Lymphocyten mit azurophiler Granulation.

Veränderungen, die in der Häufigkeitsverteilung der Lymphocytenkernvolumina bei dem gleichen Tier im Ablauf einer Krankheit vorkommen können, sind für den Patienten 231 in Abbildung 12 dargestellt. Sie zeigt die HINTZSCHE-Verteilungen der Kernvolumina am 16. 4., 24. 4. und 30. 4., links aufgebaut mit der Grundlage 65, rechts mit 190.

Dabei sind die absoluten Zahlen pro /ul Blut angegeben, die aus dem prozentualen Anteil der rundkernigen Zellen im Differentialblutbild und der Leukocytenzahl /ul Blut berechnet wurden.

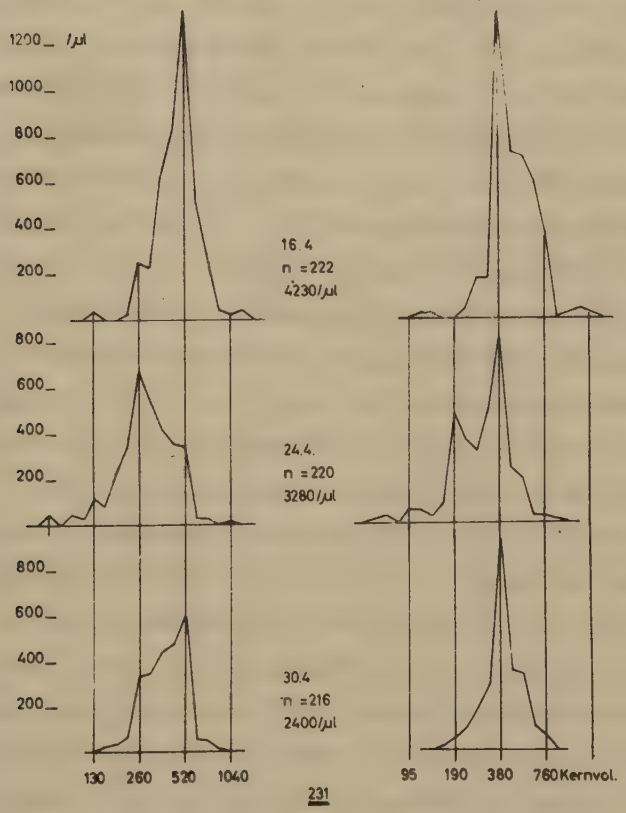


Abb. 12: HINTZSCHE-Verteilung der Lymphocytenkernvolumina bei Hund 231 zu verschiedenen Zeitpunkten.

Am 16. 4. herrschten Zellen mit großen Zellkernen vor. Sie stellen sich als Maxima über 520 bzw. 380 dar. Beide Darstellungen lassen neben dem Maximum (520 bzw. nach 380) Häufigkeiten erkennen, die die Anpassung an den reinen Typ der HINTZSCHE-Verteilung beeinträchtigen. Am 24. 4. traten neben den großkernigen Zellen auch in beträchtlicher Menge Zellen mit kleineren Kernen auf, die sich als Gipfel über 260 bzw. 190 darstellen. Diesmal kommt die Verteilung auf der Basis 190 der "idealen" HINTZSCHE-Verteilung näher als die auf das Volumen 65 aufgebaute. Am 30. 4. waren die Zellen mit kleinerem Kern geringer vertreten als am 24. 4. Im Prinzip ähneln sich die beiden Darstellungen vom 30. 4. und 16. 4. , nur sind am 30. 4. weniger rundkernige Zellen im Blut vorhanden. Wie bei den Angaben über die einzelnen Patienten vermerkt, traten bei dem Hund 231 am 16. 4. zahlreich, relativ seltener am 24. 4. als "abnorme Rundzellen" bezeichnete Zellformen im Blut auf, die sich von den üblicherweise vorkommenden Lymphocyten unterschieden. Die Zellen waren groß und trugen z. T. die Merkmale sog. Reizformen, z. B. ausgeprägte Cytoplasmabasophilie. Es ist bemerkenswert, daß die Abnahme der großkernigen Zellen im Blut einhergeht mit einer Verschlechterung der sonstigen Blutbefunde. Gegenüber dem 16. 4. war am 24. 4. die Erythrocytenzahl vermindert, die Leukocytenzahl erhöht, es trat eine Linksverschiebung auf und die Blutsenkung war beschleunigt.

Besprechung

Die karyometrische Untersuchung von Zellen liefert ein morphologisches Kriterium, dessen Feststellung trotz der präparativen Einwirkung und des unvermeidlichen Meßfehlers zu Werten führt, die vergleichbar und reproduzierbar sind. Das ergibt sich aus der Gegenüberstellung unseres Materials von 2800 Lymphocytenkernen, die von Blutausstrichen kranker Hunde stammten, mit dem von SCHULZE, der mit gleicher Technik 2600 Kerne von Lymphocyten klinisch gesunder Hunde ausgemessen hat. Auch die Untersuchungen von WEILAND, die an Hunden mit Leukosen durchgeführt wurden, brachten, was die Kerngröße der Rundzellen des Blutes betrifft, Ergebnisse, die sich im gleichen Rahmen halten. Unterschiede, die zwischen den genannten Gruppen bestehen, zeigen sich vor allem in der Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen. Für die Lymphocyten des Rindes haben v. MICKWITZ und NIEPAGE gezeigt, daß bei Vermehrung der Lymphocytenzahl im Blut die großkernigen Formen auch relativ zunehmen. Sie beschränkten sich bei ihren Untersuchungen auf die Bestimmung des Durchmessers der Lymphocytenkerne im Blutausstrich. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenso wie bei SCHULZE und WEILAND aus zwei Durchmessern des Kernes das Volumen berechnet. Der Vergleich der arithmetischen Häufigkeitsverteilungen der Kernvolumina klinisch gesunder und kranker Hunde (Abbildung 4) zeigt, daß bei den kranken Hunden große Lymphocytenkerne häufiger vorkommen als bei gesunden. Dabei muß die Zahl der Lymphocyten n i c h t vermehrt sein. Für diejenigen Fälle,

bei denen sowohl die Leukocytenzahl als auch das Differentialblutbild vorliegt, kann die Zahl der Lymphocyten im /ul Blut berechnet werden. Sieht man von dem Blutbild des Hundes 231 am 16. 4. mit etwa 4000 Lymphocyten / /ul ab, so beträgt die Lymphocytenzahl unserer Patienten im Mittel 2000 ± 892 (700-3500). Als Norm wird im Biological Handbook 2500 (900-4500) angegeben. Wegen der geringen Lymphocytenzahl wurden für unsere Untersuchungen Anreicherungspräparate aus dem Leukocytensaum des WINTROBE-Hämatokrit verwendet.

Die Verwendung des Kernvolumens als Maß der Kerngröße hat den Vorteil, daß man prüfen kann, ob die Gesamtheit der gemessenen Zellkerne dem JAKOBJschen Gesetz der Volumenhalbierung untergeordnet ist. Nach JAKOBJ treten Zellen, die auf die gleiche Stammform zurückgehen, wegen des rhythmischen Verdopplungswachtums vorwiegend in bestimmten Größen auf, die sich wie 1 : 2 : 4 : 8 u.s.w. verhalten. Abweichungen davon folgen dem Zufallsgesetz. An Zellkernen läßt sich wegen der Einfachheit der Messungen das JAKOBJsche Gesetz am besten nachweisen. Das Erythrocytensystem kann als Beispiel dafür dienen, daß bei der Teilung des Zellkerns eine Volumenhalbierung erfolgt. Demzufolge hat die erythropoetische Stammzelle das größte Kernvolumen; die späteren Formen haben Kernvolumina, die von Generation zu Generation die Hälfte, ein Viertel, ein Achtel u.s.w. des Kernvolumens der Stammzelle betragen. In der Darstellungsweise nach HILTZSCHE gibt die Häufigkeitsverteilung eines Materials von Kernvolumina, das dem

JAKOBJschen Gesetz folgt, ein typisches Bild. Über vorher bestimmten, in gleichem Abstand voneinander befindlichen Stellen der Abszisse treten spitze Gipfel auf, deren Höhe der Anzahl der Zellkerne entspricht, die der jeweiligen Größenklasse zugehören. Zwischen den Gipfeln sind die Häufigkeiten deutlich geringer; sie bilden keine Zwischengipfel.

Entsteht bei dieser Art der Darstellung n i c n t die typische Kurve, wie sie z. B. die erythropoetischen Zellen des Knochenmarkes liefern, von denen sicher ist, daß sämtliche Zellen dem gleichen Stammbaum angehören, so muß man folgern, daß das zugrunde liegende Zellmaterial keinen gemeinsamen Stammbaum hat. Anhand der Kernmessungen von SCHULZE stellte NIEPAGE fest, daß die Kernvolumina stets eine atypische Verteilung lieferten, auf welches Kernvolumen die Verhältnisse 1 : 2 : 4 : 8 u.s.w. auch gegründet wurden. Er kam schließlich zu zwei Kernvolumina, 65 und 190, die - als Grundlage einer HINTZSCHE-Verteilung verwendet - Häufigkeitsverteilungen entstehen ließen, die einigermaßen dem reinen Typ nahekamen. Jede dieser beiden Darstellungen ließ jedoch an mindestens einer Stelle einen atypischen Zwischengipfel entstehen (Abbildung 8, oben). Dieser Befund macht es wahrscheinlich, daß unter den sog. Lymphocyten des Hundes Vertreter zweier, am Kernvolumen unterscheidbarer Zelltypen vorkommen.

Die Verwendung der bei gesunden Hunden als am besten geeignet gefundenen Kernvolumen-Grundklassen 65 und 190 war

auch für die Darstellung des Materials kranker Hunde gerechtfertigt, weil die individuellen Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Patienten Häufungsstellen im näheren Bereich dieser Kerngrößen, bzw. nahe den nach JAKOBJ zu erwartenden Vielfachen dieser Größen ergaben.
Wie in den Abbildungen 6 und 7 gezeigt wurde, paßt sich das Kernmaterial des einen Hundes der 65iger, das des anderen der 190iger HINTZSCHE-Darstellung besser an. Eine vollkommene Übereinstimmung mit dem typischen Bild tritt in keinem Falle auf. Die Vergrößerung des vergleichbaren Materials durch Zusammenfassung sämtlicher Werte macht demgegenüber deutlich, daß für die Lymphocytenkerne der kranken Hunde die Einteilung 95 : 190 : 380 ein besseres Ergebnis bringt als das 65iger Modell (Abbildung 8, unten). Dieser Befund legt die Folgerung nahe, daß unter den Bedingungen der Krankheit Lymphocyten, deren Zusammengehörigkeit durch Kernvolumina der Größen 95, 190, 380 gegeben ist, das Bild im Blut beherrschen, während bei gesunden Hunden die Mehrzahl der Lymphocyten der Zellart mit den Volumina 65, 130, 260 angehört.
Der Versuch einer Gruppierung der Lymphocyten des Blutes mit Hilfe des Kernvolumens wurde ergänzt durch die Zusammenfassung von Zellen, denen ein anderes morphologisches Kriterium gemeinsam war. Dabei wurde Cytoplasmamangel, die Cytoplasmaanfärbung und das Vorkommen von azurophilen Granula berücksichtigt. Jede nach einem dieser Merkmale zusammengestellte Gruppe von Zellen wurde in Bezug auf ihr Kernvolumen nach HINTZSCHE auf der Grund-

lage der Volumenklasse 65 und 190 dargestellt. Die Hoffnung, daß Zellen, die nach einem bestimmten morphologischen Kriterium ausgesondert waren, in einem der beiden HINTZSCHE-Schemen einer "idealen" Gipfelfolge nahekommen würden, wurde nur für die Lymphocyten mit azurophiler Granulation erfüllt. Zellen dieser Art ergaben eine befriedigende Anpassung an das 190iger Schema, Kernvolumina um 380 waren weitaus am häufigsten vertreten. Demgegenüber erwies sich die Anpassung an das HINTZSCHE-Schema auf der Basis 65 als sehr unbefriedigend. Danach scheinen azurophil-granulierte Lymphocyten derjenigen Zellserie anzugehören, die durch das Vorherrschen der Kernvolumina 380, 190 u.s.w. gekennzeichnet ist. Cytoplasmaarmut, bzw. die Art der Anfärbung des Cytoplasmas sind dagegen keine für die Zugehörigkeit zu einer der beiden Zellserien charakteristischen Merkmale.

Unter Berücksichtigung der absoluten Lymphocytenzahl pro cmm^3 Blut zu verschiedenen Zeiten wurden die Kernvolumina der rundkernigen Zellen des Hundes 231, dessen hämatologische Befunde ihre Ursache höchstwahrscheinlich in einer Listeriose hatten, nach HINTZSCHE dargestellt. Das Beispiel zeigt, daß die zuerst auftretende Lymphocytose aus vorwiegend großkernigen Zellen bestand, die sich allerdings nicht der einen oder anderen Zellserie mit Sicherheit zuordnen ließen. Eine Woche später waren bei abnehmender Lymphocytenzahl die Zellen mit kleinen Kernen häufiger als vorher. Da das vermehrte Auftreten kleinkerniger Lymphocyten zugleich mit anderen, verstärkt pathologischen

Blutbefunden einherging, und im weiteren Verlauf, bei abermals verminderter Lymphocytenzahl pro cmm^3 Blut die großkernigen Zellen relativ wieder häufiger wurden, scheint in diesem Fall, neben der Ausschüttung großkerniger Zellen am Anfang auch die Vermehrung kleinkerniger Lymphocyten ein Merkmal der Aktivität des Prozesses gewesen zu sein.

Überblickt man abschließend die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, so ist festzustellen, daß die Kernvolumina der Lymphocyten kranker Hunde sich über annähernd den gleichen Größenbereich erstrecken wie die Lymphocytenkerne klinisch gesunder Hunde. Großkernige Zellen sind jedoch bei den kranken Tieren meist relativ häufiger. Wird eine Gruppierung der Zellkernvolumina nach dem Schema von HINTZSCHE auf der Basis der Volumina 65, bzw. 190, die sich für Lymphocytenkerne klinisch gesunder Hunde als geeignet erwiesen haben, vorgenommen, so läßt sich eine vollends befriedigende Anpassung ebensowenig erzielen wie bei Lymphocytenkernen gesunder Hunde. Das spricht dafür, daß die Lymphocyten des Hundes nicht einem gemeinsamen Stammbaum angehören. Es scheint sich um zwei verschiedene Zellserien zu handeln, von denen die Serie mit den Kernvolumina 190, bzw. 380 bei kranken Hunden zahlreicher vertreten ist als die Serie mit den Volumina 65, 130, 260, deren Vertreter bei gesunden Hunden vorherrschen.

Die azurophil granulierten Lymphocyten gehören vorwiegend

der zuerst genannten Zellserie an. Am Verlauf einer mit Lymphocytose einhergehenden Reaktion läßt sich die Verschiebung in den Häufigkeiten der Lymphocytenkerngrößen zeigen.

Zusammenfassung:

Bei 14 an verschiedenen Krankheiten leidenden Hunden wurden in Ausstrichpräparaten, die von der Leukocytenschicht des WINTROBE-Hämatokrit gewonnen waren, je zwei Durchmesser der Lymphocytenkerne gemessen und zur Berechnung des Kernvolumens verwendet. Die insgesamt 2800 Kernvolumina wurden in der arithmetischen Häufigkeitsverteilung und in der Darstellungsweise nach HINTZSCHE für jeden Hund zusammengefaßt und mit dem im gleichen Verfahren bei klinisch gesunden Hunden gewonnenen Material von SCHULZE verglichen.

Kranke Hunde hatten, auch wenn keine Lymphocytose vorlag, relativ mehr großkernige Lymphocyten als gesunde Hunde. Die HINTZSCHE-Verteilungen wurden auf die Volumenklassen 65 und 190 aufgebaut, die sich für die Lymphocytenkerne klinisch gesunder Hunde als geeignet herausgestellt hatten. Die Verteilungen machten deutlich, daß sich die Kernvolumina dem JAKOBJschen Gesetz der rhythmischen Volumenverdoppelung nicht vollkommen anpassen ließen. Sie legten die Folgerung nahe, daß die Lymphocyten beim kranken ebenso wie beim gesunden Hund aus zwei, bei ausreichender Anzahl von Messungen am Kernvolumen unterscheidbaren Zellserien zusammensetzen. Sie sprechen dafür, daß bei klinisch gesunden Hunden Lymphocyten mit den Kerngrößen 65, 130 und 260 überwiegen, während beim kranken Hund die Zellserie mit den Volumina 190 und 380 besonders zahlreich vertreten ist. Die Lymphocyten mit azurophiler

Granulation gehören der zuletzt genannten Gruppe an. An einem Beispiel wurden die Veränderungen in der Verteilung der Lymphocytenkerngrößen während des Ablaufs einer lymphatischen Reaktion verfolgt.

Literaturverzeichnis:

1. Albritton, E. C. : Standard values in blood
Philadelphia u. London 1955

2. Begemann, H. : Zur Physiologie und Physiopathologie des lymphatischen Systems.
Pro medico 1951

3. Braunsteiner, H. : Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen.
Thieme, Stuttgart 1959

4. Franke, H. : Phasenkontrasthämatologie
Thieme, Stuttgart 1954

5. Freerksen, E. : Ein neuer Beweis über rhythmisches Wachstum der Kerne durch vergleichende volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen von Meerschweinchen und Kaninchen.
Zschr. Zellforschung 18 (1933) 362

6. Gall, L. : Amer. J. Med. Sc. 1936, 380
cit. bei Leibetseder im Handb. d. ges. Hämatologie von Heilmeyer, L. und Hittmair, A.
Urban u. Schwarzenberg 1957
München u. Wien

7. Gleiss, J. und Sparrer, H. : Über die Bedeutung der azurgranulierten Lymphocyten bei akuten Infektionskrankheiten des Kindesalters.
Zschr. Kinderheil, München
72 (1952) 214

8. Grundmann, E. : Karyologische und karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenpunktaten bei Stickstoff-Lost-Therapie.
Zschr. exper. Med. 118 (1952) 489

9. Grundmann, E. : Lokalisation und Struktur zweier verschiedener Lymphocytensysteme bei der Ratte.
Verh.dtsch.Ges.Path. 41 (1957) 261

10. Grundmann, E. : Die Bildung der Lymphocyten und Plasmazellen im lymphatischen Gewebe der Ratte.
Beitr. path. Anat. u. allg. Path. (Ziegler-Aschoff) 119 (1958) 217

11. Grundmann, E. : Lokalisation und Struktur zweier verschiedener Lymphocytensysteme.
Beitr. path. Anat. u. allg. Path. (Ziegler-Aschoff) 119 (1958) 217a

12. Grundmann, E. : Die Lymphocytenbildung und ihre experimentelle Beeinflussung.
Klin. Wschr. 36 (1958) 337

13. Grundmann, E. : Der morphologische Nachweis von zwei Lymphocytensystemen beim Menschen.
Klin. Wschr. 37 (1959) 941

14. Grundmann, E. : Neuere Befunde über Entstehung und Bedeutung der Lymphocyten.
Dtsch. med. Wschr. 85 (1960) 741

15. Hansen, H. G. : Die Physiologie des Lymphocytenstoffwechsels und seine Beeinflußbarkeit durch Hormone des Hypophysen-Adrenal-Systems.
Thieme, Stuttgart 1958

16. Heidenhain, M. : Plasma und Zelle
Jena 1907

17. Heidenhain, M. : Plasma und Zelle. Eine allgemeine Anatomie der lebendigen Masse.
Anatom. Anzeiger 40 (1912) 102

18. Heidenhain, M. : Plasma und Zelle. Eine allgemeine Anatomie der lebendigen Masse.
Arch. mikrosk. Anat. 85 (1914) 365

19. Heidenhain, M. : Über die Grundlagen einer synthetischen Theorie des tierischen Körpers.
Klin. Wschr. 97 (1925) 102

20. Heilmeyer, L. : Handb. der inn. Med. 3 Aufl.
Urban u. Schwarzenberg Band 2
München u. Wien 1951

21. Heilmeyer, L. : Heilmeyer, L. und Hittmair, A.
Handb. der ges. Hämatologie
Urban u. Schwarzenberg 1957
München u. Wien

22. Heilmeyer, L. und Begemann, H. : Atlas der klinischen Hämatologie und Cytologie.
Springer-Verlag, Berlin 1955

23. Hempelmann, L. H. und Knowlton, N. P. : The Nature of Neutral Red Staining Refractive Particles in the Lymphocytes of the Blood of Normal Humans.
Blood 8 (1953) 524

24. Hernberg, C. A. : The effect of adrenalectomy, cold stress and postoperative treatment with cortison on the mean lymphocyte diameter in the rat.
Act. med. Scand. 149 (1953) 2

25. Hertwig, R. : Über Korrelation von Zell- und Kerngröße und ihre Bedeutung für die Differenzierung und die Teilung der Zelle. Biol. Zbl. 23 (1903) 49

26. Hertwig, R. : Über neue Probleme d. Zellenlehre. Arch. Zellforsch. 1 (1908) 1-32

27. Hintzsche, V. E. : Statistische Probleme aus der Kerngrößenforschung. Experientia, Vol.I/4 (1945) 103

28. Jakobj, W. : Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Roux'Archiv f. Entw. mechan. 106 (1925) 124

29. Jakobj, W. : Gesetz vom rhythmischen Kernwachstum. Anat. Anz. 63 Erg. H. 222 (1927)

30. Jakobj, W. : Volumetrische Untersuchungen an den Zellkernen des Menschen und das allgemeine Problem der Zellgröße. Anat. Anz. 72 Erg. H. 236 (1931)

31. Jakobj, W. : Die Zellkerngröße beim Menschen Zschr. f. mikr. anat. Forsch. 38, (1935) 161

32. Jakobj, W. : Die Zellkerngrößen beim Menschen. Zschr. f. mikr. anat. Forsch. 42, (1937) 170

33. Jakobj, W. : Die verschiedenen Arten des gesetzmäßigen Zellwachstums und ihre Beziehungen zu Zellfunktionen, Umwelt, Krankheit, maligner Geschwulstbildung und innerem Bauplan. Roux'Archiv f. Entw. mechan. 141, (1942) 584

34. Krause, G. : Das lymphatische Gewebe und seine Kerngrößen. Rostock, med. Diss. 1935

35. Lennert, K. und Remmele, W. : Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen. Acta haemat. 19, (1958) 99

36. v. Mickwitz C. U. und Niepage, H. : Kernmessungen an Lymphocyten des Rindes. Berliner Münchener tierärztl. Wschr. 72, (1959) 31

37. Mondry, G. : Über die Kerngrößen der Lymphocyten in sogenannten Keimzentren. Rostock, med. Diss. 1937

38. Niepage, H. : Untersuchungen über das Differentialblutbild des Rindes. Zbl. Vet. med. 8, (1961) 282

39. Niepage, H. : Persönliche Mitteilung, 1964

40. Rind, H.-J. : Atlas der Phasenkontrasthämatologie, Akademie-Verlag, Berlin 1958

41. Schermer, S. : Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. J. A. Barth-Verlag, Leipzig 1954

42. Schleip, K. und Alder, A. : Atlas der Blutkrankheiten. Urban u. Schwarzenberg 1949 München u. Wien

43. Schulten, H. : Lehrbuch der klinischen Hämatologie. Urban u. Schwarzenberg 1948 München u. Wien

44. Schulten, H. : Morphologie der normalen und pathologischen Stammzellen, der Vorstufen und der reifen Zellen. In Handb. der ges. Hämatologie Heilmeyer, L. und Hittmair, A. Urban u. Schwarzenberg 1957 München u. Wien

45. Schulze, G. : Kernmessungen an Lymphocyten des Hundes. Berlin FU, vet. med. Diss. 1962

46. Stobbe, H. : Hämatologischer Atlas Akademie-Verlag, Berlin 1960

47. Takeda, K. und Nakai, Y. : Nippon koku gakkai Zasshi. 14 (1951) 131 cit. bei 35

48. Tanner, H. und Hintzsche, V. E. Über Beziehungen zwischen Nahrungsaufnahme und Kerngröße des Darmepithels. Zschr. mikr. anat. Forschg. 42 (1937) 83

49. Tocantins, M. : Fortschritte der Hämatologie. Thieme-Verlag, Stuttgart 1961 Übersetzt von Braunsteiner, E.

50. Undritz, E. : Hämatologische Tafeln Sandoz, Basel 1949

51. Vorbeck, F. W. : Über die Kerngrößen lymphatischen und lymphoiden Gewebes.
Rostock, med. Diss. 1935

52. Weicker, H. : Zellteilung, Zellteilungsstörungen.
In Handb. d. ges. Hämatologie, Heilmeyer, L. u. Hittmair, A.
Urban u. Schwarzenberg, 1957
München u. Wien

53. Weiland, G. : Kernmessungen an Rundzellen im gefärbten Blutausstrich leukosekranker Hunde.
Berlin FU, vet. med. Diss. 1965

54. Wilfingseder, P. : Karyometrik
Mikroskopie Wien 3 (1948) 243

55. Wirth, D. : Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere.
2. Auflage
Urban u. Schwarzenberg 1950
München u. Wien

Für die Überlassung des Themas und Hilfe bei der Auswertung und Darstellung danke ich Herrn Prof. Dr. Niepage. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sage ich Dank für die Unterstützung mit Sachmitteln.

Lebenslauf

Am 4. Mai 1940 wurde ich als Sohn des Bäckermeisters Fritz Treppenhauer und seiner Ehefrau Margarete, geb. Haase, in Berlin geboren.
Von 1946 - 1954 besuchte ich die Grundschule in Görsdorf b. Storkow (Mark). Anschließend absolvierte ich die Kurt-Steffelbauer-Oberschule, wo ich dann auch am 6. Juli 1958 mein Abitur ablegte. Zwecks Anerkennung meiner Reifeprüfung ging ich anschließend ein Jahr auf die Leibniz-Schule in Berlin-Kreuzberg.
Im Wintersemester 1959/60 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin. Hier bestand ich dann auch am 23. 10. 61 das Physikum und am 14. 11. 64 das Staatsexamen. Als Veterinärpraktikant arbeitete ich dann bis zum 15. 6. 1965 in der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten der gleichen Universität.

Tabelle

	98	207	204	217	215	227	231	104	81	82	83	6	24	51	60	
	26/10.	22/1.	15/1.		8/2. A + B		16.,24. u.31.2.	23/11.	12/8.	26/8.	26/8.	10/7.	28/1. A + B.	13/3.	A + B	
μ^3																
bis 40	0	0	0	6	2	0	0	0	1	0	2	0	1	4	0	19
80	0	7	7	5	10	13	3	10	3	21	6	2	27	70	4	188
120	0	19	9	13	22	20	7	10	6	22	23	35	37	19	5	247
160	4	18	10	10	25	35	12	11	10	31	11	29	36	9	5	256
200	9	17	8	15	25	30	28	7	9	11	14	16	19	4	11	223
240	17	10	12	19	27	23	39	12	4	4	17	10	25	0	9	228
280	25	5	8	21	39	21	44	13	10	7	14	6	19	1	24	257
320	11	11	13	25	33	13	67	7	10	5	10	3	15	0	23	246
360	7	4	14	21	29	12	88	13	11	3	3	0	5	0	35	245
400	8	3	7	14	25	15	74	5	15	1	6	1	11	0	27	212
440	7	6	8	16	30	12	78	5	2	0	1	1	4	0	19	189
480	5	4	3	9	20	12	44	3	5	2	1	0	8	0	21	137
520	4	2	3	10	13	1	55	3	5	0	0	0	1	0	11	108
560	3	2	2	8	7	4	42	1	4	1	0	0	0	0	9	83
600	3	0	1	9	8	5	20	2	3	0	0	0	2	0	3	56
640	2	0	2	8	3	1	20	0	4	0	0	0	2	0	4	46
680	0	0	0	1	2	0	10	0	2	0	0	0	0	0	0	15
720	0	0	1	2	1	0	10	1	0	0	0	0	0	0	1	16
760	0	0	0	2	2	0	7	0	1	0	0	0	0	0	1	13
800	0	0	0	0	1	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	7
840	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
880	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
920	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
960	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1040	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
1080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1120	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1160	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1320	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	105	108	108	215	326	217	658	106	106	108	108	103	213	107	214	2803